



REC'D 22 SEP 2003	
WIPO	PCT

#2

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 03 JUL 2003

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

Best Available Copy



INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*02

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 2 W / 010301

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>2 JUIL 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0208234</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>- 2 JUIL. 2002</b>		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>  CABINET ORES 6 avenue de Messine 75008 PARIS	
<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b> VCstsF668/174FR			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> ISOLAT DE PROTEINES DE LAIT ET PROCEDE POUR SA PREPARATION.			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		COMPAGNIE LAITIERE EUROPEENNE	
Prénoms			
Forme juridique		Société en Commandite par Actions	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège		Rue _____	
		Code postal et ville <b>15 0 8 9 0   CONDE SUR VIRE</b>	
		Pays <b>FRANCE</b>	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
		<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

REMISE DES PIÈCES DATE <b>2 JUIL 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0208234</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	OB 540 4 W / 010801
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>		VCstsF668/174FR	
<b>6 MANDATAIRE</b> <i>(s'il y a lieu)</i> Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		ORES Béatrice CABINET ORES	
Adresse	Rue	6 avenue de Messine	
	Code postal et ville	75 008 PARIS	
	Pays	FRANCE	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01.45.62.75.00	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01.45.62.04.86	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		ores@cabinet-ores.com	
<b>7 INVENTEUR(S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance <i>(en deux versements)</i>		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention <i>(joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence)</i> : AG	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», Indiquez le nombre de pages jointes			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR</b> ou DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) ORES Béatrice (92-4046)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

La présente invention a pour objet un nouveau procédé d'isolement de protéines de lait, la composition, isolat de protéines de lait ou fraction protéique laitière, en résultant et ses applications, notamment alimentaires et pharmaceutiques.

On connaît plusieurs documents de l'art antérieur décrivant la purification  
5 de protéines de lait.

Le document EP-253395 décrit l'obtention d'une lactoferrine bovine de haute pureté (>80% en une étape ou >98% en deux étapes) par adsorption de lait ou de lactosérum sur une résine échangeuse de cations comprenant des radicaux carboxyméthyle, puis rinçage et désorption de la lactoferrine.

10 Le document EP-348508 décrit également un procédé de préparation d'une lactoferrine bovine de haute pureté (>95%) par adsorption de lait ou de lactosérum sur une résine échangeuse de cations de type polysaccharide comprenant des fonctions ester d'acide sulfurique et élution par une solution aqueuse de sel.

15 Le document EP-298875 décrit un procédé permettant d'isoler certaines protéines du lactosérum par adsorption sur un support minéral poreux sous forme de grains, ces grains étant recouverts d'une couche de polysaccharide aminé présentant en surface des groupements fonctionnels acides, tels que des groupements carboxyliques ou sulfoniques.

20 Le document EP-418704 décrit un procédé pour purifier séquentiellement la lactoferrine et la lactoperoxydase par élution sur une colonne chargée avec une résine polysaccharide greffée par des groupes acide sulfonique.

Le document US-6,096,870 décrit un procédé de séparation séquentielle de protéines du petit lait par élution sur des résines cationiques.

25 Le document EP-1017286 décrit un procédé de séparation séquentielle de protéines du petit-lait par chromatographie à flux radial.

La lactoferrine et la lactoperoxydase sont des protéines du lait dotées de propriétés intéressantes : leur capacité à lier le fer leur confère un rôle d'agent anti-bactérien contre les bactéries dont le métabolisme requiert d'importantes quantités de fer. La lactoperoxydase est indispensable au marquage protéique par l'iode. La lactoferrine  
30 favorise la croissance des lymphocytes et favorise l'absorption du fer par l'organisme, elle régule la différenciation des leucocytes et elle inhibe la peroxydation des lipides.

Toutefois, tous ces documents concernent des procédés visant à obtenir une lactoferrine et/ou une lactoperoxydase les plus pures possibles, c'est-à-dire des procédés visant à réduire le plus possible la proportion des autres protéines initialement

présentes dans le lait ou le lactosérum. En outre, les conditions de fixation de la matière première et d'élution des protéines sont des conditions douces, avec des flux de matières lents. En revanche, l'objectif que s'est fixé la demanderesse est l'obtention d'une fraction protéique laitière comprenant entre autres constituants de la lactoferrine et de la

5 lactoperoxydase, mais comprenant surtout une proportion des autres protéines plus élevée que dans le lait ou le lactosérum de départ. Pour cela la demanderesse a mis au point un procédé avec des flux beaucoup plus élevés que ceux décrits dans les documents analysés ci-dessus, ce procédé permettant une fixation plus sélective vis-à-vis de certaines protéines.

Le document WO93/13676 divulgue un procédé permettant d'isoler la  
10 lactoferrine et la lactoperoxydase par passage sur une résine échangeuse de cations à flux élevé, à partir de petit-lait. Ce procédé se distingue du procédé selon la présente invention par le fait que le flux est plus élevé que dans le procédé selon l'invention (supérieur à 5 m/h) et qu'il vise à purifier la lactoferrine et la lactoperoxydase, et non pas à obtenir une fraction protéique laitière particulière contenant un taux relativement élevé des autres  
15 protéines et dotée de propriétés biologiques améliorées.

On connaît également, par le document EP-704218 un agent destiné à renforcer les os, cet agent comprenant une fraction protéique basique ou une fraction peptidique basique, issues du lait et obtenues par passage du lait sur une résine cationique et élution. Toutefois, les conditions d'adsorption et d'élution décrites dans ce document  
20 sont distinctes de celles employées dans le procédé selon l'invention et permettent d'isoler une fraction protéique distincte de celle obtenue selon la présente invention.

Les documents JP-8165249, JP-9187250, JP-9294537 et EP-1010430 décrivent des compositions destinées au renforcement des os et/ou de prévention des maladies parodontales, ces compositions comprenant une fraction protéique basique  
25 dérivée du lait obtenue par adsorption du lait et élution sur une résine cationique. Toutefois, les conditions d'adsorption et d'élution décrites dans ces documents sont distinctes de celles employées dans le procédé selon l'invention et permettent d'isoler une fraction protéique distincte de celle obtenue selon la présente invention.

Ainsi, c'est avec étonnement que la demanderesse a découvert un  
30 nouveau procédé d'isolement de protéines de lait permettant d'obtenir une fraction protéique laitière dotée de propriétés biologiques améliorées, notamment une fraction protéique laitière favorisant la croissance des ostéoblastes.

L'invention a pour objet un procédé d'isolement de protéines de lait à partir de lait ou d'un lactosérum comportant les étapes suivantes :

- a) le lait ou le lactosérum est stérilisé et dégraissé ;
- b) la fraction laitière issue de l'étape a) est passée sur une résine échangeuse de cations conditionnée dans une colonne d'élution ;
- c) la fraction retenue sur la résine est éluée par une solution aqueuse salée ;
- d) l'éluat résultant de l'étape c) est dessalé, de préférence par ultrafiltration, et diafiltration puis stérilisé, de préférence par microfiltration.

Ce procédé étant caractérisé en ce que :

- α) la résine échangeuse de cations est une résine greffée par des fonctions acides fortes ;

le paramètre BV désignant le rapport du volume de matière première au volume de résine humide dans la colonne,

le paramètre SV désignant le rapport du débit d'alimentation de la colonne au volume de résine humide dans la colonne,

- le paramètre LV désignant le rapport du débit d'alimentation de la colonne à la section de la colonne,

β) au cours de l'étape b), les paramètres de fixation ont les valeurs suivantes :

- $BV_f$  est compris entre 80 et 120 ;
- $SV_f$  est compris entre 8 et 15  $h^{-1}$  ;
- $LV_f$  est supérieur ou égal à 3 m/h et inférieur ou égal à 4,8 m/h .

γ) au cours de l'étape c), les paramètres d'élution ont les valeurs suivantes :

- $BV_e$  est compris entre 3 et 7 ;
- $LV_e$  est inférieur à 1 m/h, de préférence inférieur à 0,5 m/h.

On peut utiliser comme produit de départ dans le procédé selon l'invention soit du lait, soit du lactosérum, préférentiellement issus de la vache. Le lactosérum est le liquide résiduel obtenu après l'extraction des protéines et de la matière grasse du lait ou du petit-lait. On distingue en général deux catégories de lactosérum, selon que son acidité est inférieure ou supérieure à 1,8 g d'acide lactique/l : le lactosérum doux, issu de la fabrication de fromage à pâte pressée cuite ou non cuite (emmental, saint-paulin etc.) et le lactosérum acide, issu de la caséine ou d'autres fromages obtenus par coagulation mixte ou lactique (pâtes molles, pâtes fraîches). La composition moyenne du lactosérum

doux est à titre indicatif, pour 61 g de matières sèches par kg de lactosérum, de 42 à 48 g de lactose, 8 g de protéines, 2 g de graisses, 5 à 7 g de minéraux, 1 à 5 g d'acide lactique et le reste en minéraux et vitamines.

Préférentiellement, on utilise comme produit de départ du lait, et  
 5 avantageusement du lait de vache, dont la composition permet, par le procédé selon l'invention, l'obtention d'un isolat de protéines ayant des propriétés biologiques plus intéressantes.

Dans la première étape du procédé, le lait ou le lactosérum sont stérilisés et dégraissés par écrémage, de façon connue :

10 L'écémage du lait désigne la séparation de la crème du lait, quel que soit le procédé mis en œuvre pour obtenir cette séparation.

De façon traditionnelle, la fabrication de la crème se fait selon un processus naturel : lorsque le lait repose, les éléments qui le composent se séparent en fonction de leur densité. Les globules de matière grasse étant plus légers que l'eau  
 15 remontent à la surface pour former une couche de crème. En production industrielle, la formation de la crème est accélérée par passage du lait dans une écrémeuse centrifuge.

De façon habituelle, la pasteurisation est faite par un chauffage contrôlé de courte durée de façon à éliminer les germes pathogènes éventuellement présents dans la crème. Avantageusement, la pasteurisation est faite à une température comprise entre 80 et  
 20 95°C.

La matière première stérile et dégraissée est alors passée sur une résine échangeuse de cations. Selon l'invention la résine échangeuse de cations est une résine greffée par des fonctions acides fortes et ayant une capacité d'échange d'ions comprise entre 200 et 1000  $\mu\text{E/ml}$ , de préférence entre 400 et 700  $\mu\text{E/ml}$ . Notamment elle peut être  
 25 greffée par des fonctions acide sulfonique, généralement sous forme de sels de sulfonate pour leur mise en œuvre, la nature du sel étant déterminée par la solution qui a servi à conditionner la colonne avant la mise en œuvre du procédé. Préférentiellement, on choisit un greffage par des groupements aromatiques ou aliphatiques porteurs de fonctions acide sulfonique, encore plus préférentiellement sous forme de sels de propyl sulfonate. La  
 30 résine sur laquelle sont greffées les fonctions acide sulfonique peut être de toute nature, notamment polyacrylique ou polystyrène. La granulométrie de la résine est avantageusement comprise entre 100  $\mu\text{m}$  et 900  $\mu\text{m}$ , de préférence entre 200 et 750  $\mu\text{m}$ , encore plus préférentiellement entre 250 et 600  $\mu\text{m}$ . La résine utilisable selon l'invention doit préférentiellement présenter une densité supérieure à 1,15.

Parmi les résines commercialement disponibles utilisables dans la présente invention, on peut citer notamment : la résine Trisacryl SP ® commercialisée par la société BIOSEPRA, la résine MacroPrep High S ® commercialisée par la société BioRad. De préférence, on choisit une résine polystyrène greffée par des fonctions alkyl ou aryl sulfonate.

La résine est conditionnée dans une colonne avant son utilisation, de façon connue de l'homme du métier, par traitement par une solution désinfectante et rinçage afin d'éviter la contamination par des micro-organismes. Elle est ensuite équilibrée par passage d'une solution tampon et rinçage.

L'étape b) de fixation de la matière première, lait ou lactosérum, stérile et dégraissée, se déroule dans les conditions préférentielles suivantes :

La résine est conditionnée dans une colonne dont la température est maintenue entre 2 et 15°C, préférentiellement entre 4 et 12°C. Préférentiellement, la colonne est alimentée en matière première par le bas. Avantageusement on travaille en lit fluidisé. De préférence les paramètres de fixation sont ajustés de façon à ce que :

- $BV_F$  est compris entre 50 et 400, préférentiellement entre 80 et 150 ;
- $SV_F$  est compris entre 5 et 40  $h^{-1}$ , préférentiellement entre 8 et 20  $h^{-1}$  ;
- $LV_F$  est compris entre 3 et 4,3 m/h, préférentiellement entre 3,2 et 4 m/h .

Par l'échange d'ions, les protéines de la fraction laitière utilisée comme produit de départ viennent se fixer sur les fonctions acides de la résine. Le choix des paramètres de fixation selon l'invention permet d'opérer une fixation sélective des protéines sur la colonne. Dans des conditions classiques de fixation du lait sur une résine cationique, la lactoferrine et la lactoperoxydase, majoritaires, se fixent préférentiellement sur la résine. Dans le procédé selon l'invention, les autres protéines, minoritaires, ayant un point isoélectrique élevé, donc chargées positivement au pH de la matière première utilisée (soit pH entre 6 et 7), sont favorisées par les conditions de fixation définies ci-dessus et leur proportion dans le mélange de protéines fixées sur la résine est significativement supérieure à leur proportion dans le produit de départ. Le procédé selon l'invention permet ainsi d'isoler une fraction laitière ayant une composition en protéines nouvelle par rapport aux compositions protéiques laitières de l'art antérieur et présentant des propriétés biologiques intéressantes.

L'étape c) d'élution des protéines fixées, se déroule dans les conditions préférentielles suivantes :



La résine est maintenue à une température comprise entre 2 et 15°C, préférentiellement entre 4 et 12°C. Préférentiellement, la colonne est alimentée en matière première (solution aqueuse salée) par le haut. La solution aqueuse saline employée pour la mise en œuvre de l'invention est généralement une solution d'un chlorure d'un métal alcalin tel que K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>+</sup>, Mg<sup>+</sup>. De préférence on emploie une solution aqueuse de chlorure de sodium. Avantagusement, la solution aqueuse de sel a une concentration comprise entre 2 et 25%, préférentiellement de 5 à 15% en poids de sel par poids de liquide. De préférence, la force ionique de la solution aqueuse de sel est comprise entre 1 et 2 M. Le pH de la solution d'élution est généralement compris entre 6 et 7, avantagusement entre 6,5 et 7.

De préférence les paramètres d'élution ont les valeurs suivantes :

- BV<sub>c</sub> est compris entre 3 et 5 ;

- LV<sub>c</sub> est inférieur à 0,5 m/h.

De façon connue, la colonne de résine est lavée avant une nouvelle utilisation.

Après cette étape, l'éluat obtenu contenant le mélange de protéines de lait est soumis de façon connue à une ou plusieurs étapes d'ultrafiltration et de diafiltration destinées à éliminer les sels. D'autres moyens connus de l'homme du métier tels que l'électrodialyse ou le passage sur des résines anioniques et cationiques faibles peuvent être employés dans cette étape en remplacement de l'ultrafiltration et de la diafiltration. De préférence, ce traitement est effectué jusqu'à l'obtention d'un perméat ayant une conductivité inférieure à 15 mS. Tout autre procédé permettant d'éliminer les sels, comme notamment l'électrodialyse peut être utilisée en remplacement de cette étape. La solution est alors soumise à une microfiltration destinée à stériliser le rétentat d'ultrafiltration avant séchage. D'autres moyens techniques peuvent être employés pour stériliser la fraction laitière obtenue à cette étape, notamment un traitement thermique adapté, des ultrasons ou des champs électriques pulsés.

Préférentiellement, le produit dessalé et stérilisé est séché de façon à obtenir la fraction laitière issue du procédé de l'invention sous forme d'une poudre, ce qui permet ensuite son conditionnement et son stockage. De façon connue, le séchage peut être fait par lyophilisation ou par atomisation.

La fraction protéique laitière, préférentiellement issue du lait de vache et obtenue par le procédé selon l'invention est nouvelle. Sous forme sèche, elle est caractérisée en ce qu'elle est dotée :

- d'une teneur en protéine supérieure à 90%,

- d'une teneur en sels minéraux inférieure à 1%,
- d'une teneur en matières grasses inférieure à 1%,
- d'une teneur en lactose inférieure à 1%,
- d'une teneur en humidité inférieure à 5%,
- 5 - d'une teneur en lactoferrine supérieure à 30%, et inférieure à 80%,
- d'une activité lactoperoxydase supérieure ou égale à 120 unités ABTS par mg d'isolat (ABTS = 2,2'-Azino-bis-(3-éthyl Benzo Thiazoline-6-Sulfonic Acid),
- d'un pH en solution à 2% compris entre 6 et 7,5,
- d'une pureté spectrophotométrique en UV-visible définie par un ratio
- 10  $DO^{412}/DO^{280} < 0,15$ .
- de protéines ayant un point isoélectrique supérieur ou égal à 8, les pourcentages étant donnés en poids par rapport au poids de matière sèche de la fraction laitière selon l'invention.

La mesure de DO à 412 nm donne une évaluation quantitative de la lactoferrine et de la lactoperoxydase présentes dans la fraction protéique laitière.

La mesure de DO à 280 nm donne une évaluation quantitative de la totalité des protéines présentes dans la fraction protéique laitière.

Le ratio  $DO^{412}/DO^{280} < 0,15$  montre que la lactoferrine et la lactoperoxydase sont sous-représentées par rapport aux autres protéines dans la composition selon l'invention par comparaison avec les proportions dans lesquelles elles sont présentes dans le lait et dans les fractions protéiques laitières de l'art antérieur.

De préférence, la fraction protéique laitière obtenue par le procédé selon l'invention répond au moins à l'une des caractéristiques suivantes :

- une teneur en protéine supérieure à 95%,
- 25 - une teneur en sels minéraux inférieure à 0,5%,
- une teneur en matière grasses inférieure à 0,5%,
- une teneur en lactose inférieure à 0,5%,
- une teneur en humidité inférieure à 4%,
- une teneur en lactoferrine supérieure à 50% et inférieure à 80%,
- 30 - un pH en solution à 2% compris entre 6 et 7,2,
- une pureté spectrophotométrique en UV-visible définie par un ratio  $DO^{412}/DO^{280} < 0,1$ .
- contient des protéines ayant un point isoélectrique comprise entre 8,2 et 8,7.

Les compositions selon l'invention présentent des propriétés avantageuses : notamment elles favorisent la croissance des cellules ostéoblastiques (cellules CaCo-2 et MC3T3).

Ces propriétés ainsi que les propriétés déjà connues des fractions protéiques laitières de l'art antérieur permettent d'envisager l'utilisation de ces compositions dans de nombreuses applications, notamment dans les domaines alimentaire et pharmaceutique. L'invention a donc également pour objet toute composition alimentaire, pharmaceutique et tout produit d'hygiène comprenant une fraction protéique laitière selon l'invention.

Une composition alimentaire selon l'invention pourra par exemple être un lait alimentaire, en particulier un lait destiné à l'alimentation infantile, obtenu par simple réhydratation de la poudre de fraction protéique laitière selon l'invention. L'invention a donc pour objet l'utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'invention pour la préparation d'un lait alimentaire.

L'invention a également pour objet des compositions alimentaires comprenant une fraction protéique laitière selon l'invention et d'autres ingrédients alimentaires. On peut en particulier envisager d'ajouter la fraction protéique laitière selon l'invention à un lait de vache afin d'enrichir celui-ci en certaines protéines. La présence de calcium dans les aliments comprenant la fraction protéique laitière selon l'invention sera particulièrement bénéfique dans la mesure où cette fraction protéique laitière améliore l'absorption du calcium par l'organisme humain.

L'invention a donc également pour objet l'association d'une fraction protéique laitière selon l'invention avec du calcium.

L'invention porte également sur les kits alimentaires comprenant plusieurs constituants conditionnés de façon isolée, destinés à une préparation extemporanée de l'aliment et comprenant de la poudre de fraction protéique laitière selon l'invention.

De tels aliments peuvent être utilisés pour la prévention de pathologies telles que : retard de croissance, ostéoporose, fragilité osseuse, fractures osseuses, rhumatismes, arthrose, maladies périodontales ...

Une composition pharmaceutique selon l'invention, comprenant au moins une fraction protéique laitière selon l'invention et un support pharmaceutiquement acceptable peut être utilisée dans le traitement d'une ou plusieurs des pathologies

suivantes : retard de croissance, ostéoporose, fragilité osseuse, fractures osseuses, rhumatismes, arthrose, maladies périodontales...

Bien entendu une telle composition peut en outre comporter un ou plusieurs autres actifs thérapeutiques. Du calcium peut avantageusement être associé à la  
 5 fraction protéique laitière selon l'invention. Une telle association fait partie de la présente invention. En effet, une fraction protéique laitière selon l'invention permet d'améliorer l'absorption du calcium dans l'organisme, ce qui permet d'améliorer l'effet renforçateur des os.

Des compositions pharmaceutiques ou des compléments alimentaires  
 10 selon l'invention peuvent être administrés sous toute forme appropriée telle que sous forme de poudre, de granulés, de comprimés, de gélules, de boisson, comme par exemple en solution ou en sirop. La fréquence d'administration et la dose à administrer sont adaptés de façon connue en fonction du poids et de l'âge de l'individu.

Sont également incluses dans la présente invention, les produits d'hygiène,  
 15 notamment les produits destinés à l'hygiène de la cavité buccale, tels que les dentifrices sous forme de gel ou de pâte, les bains de bouche, les gommes à mâcher, comprenant une fraction protéique laitière selon l'invention.

#### EXEMPLES :

##### Conditions générales :

20 La résine employée dans les exemples ci-dessous est une résine Trisacryl SP ®. Elle subit les traitements de conditionnement suivants avant sa mise en œuvre initiale : mise en contact avec une solution aqueuse à 0,4% du désinfectant ASEPTO ®, à raison de 3 litres de désinfectant par kilo de résine humide, suivie d'un rinçage. Mise en équilibre par passage d'un tampon acétate (80 mM, pH=5,3) contenant du chlorure de  
 25 calcium (33 g/l) et du chlorure de potassium (50 g/l), à raison de 4 litres de ce tampon par kilo de résine humide. Enfin la résine est rincée à l'eau jusqu'à l'obtention d'un éluat ayant un pH compris entre 6 et 7 et une conductivité inférieure à 5 mS.

Après chaque séquence de fixation de matière première et d'élution, la résine est nettoyée par traitement enzymatique à la protéase alcaline de Bacillus  
 30 licheniformis en tampon à pH=8, à 60°C pendant 2 heures, puis traitement par une solution de NaCl à 100g par litre pendant trente minutes (répété 2 fois). Avant sa réutilisation, elle est soumise au traitement de conditionnement exposé ci-dessus.

L'ultrafiltration est effectuée sur l'éluat à une température comprise entre 5 et 10°C sur des membranes organiques dont le seuil de coupure est de 10kD. Le facteur

de concentration volumique pratiqué est compris entre 10 et 12. La diafiltration est effectuée à une température comprise entre 15 et 25°C sur les mêmes membranes, en utilisant un volume d'eau déminéralisée compris entre 8 et 10 fois le volume de rétentat obtenu à l'issue de l'ultrafiltration jusqu'à atteindre une conductivité du perméat inférieure à

5 15mS.

La microfiltration est effectuée à 35°C à partir du rétentat issu de l'ultrafiltration /diafiltration sur des membranes céramiques de seuil de coupure de 1,4 µm.

Le séchage du perméat de microfiltration est effectué sur une tour d'atomisation à turbines avec une température d'entrée de 140°C et une température de  
10 sortie de 80°C.

#### Caractéristique de la résine :

La résine SPEC 70 est constituée d'un support chimiquement inerte et mécaniquement résistant.

Chimiquement, le support est fabriqué par polymérisation de AMPS : 2-  
15 acrylamide 2-méthyl propane sulfonic acid. La résine a une capacité d'échange d'ions entre 400 et 700 µE/ml et une capacité de fixation protéique mesurée sur la lactoferrine (minimum 20 mg/ml) ou la lactoperoxydase (minimum 40 mg/ml) ou le lysozyme (minimum 70 mg/ml) ; sa densité est supérieure à 1,15 et sa granulométrie se situe entre 250 et 560 µm.

#### Exemple 1 :

300000 litres de lait écrémé et traité thermiquement à 68°C pendant 15 secondes, sont passés à 10°C sur 3000 litres de résine échangeuse de cations (SPEC 70 fournie par BIOSEPPRA) à un débit de 14000 litres /h en flux ascendant dans deux colonnes fonctionnant en parallèle et ayant chacune un rayon de 1 mètre.

25 Les protéines fixées sur la résine sont éluées par 9000 litres d'une solution de chlorure de sodium à 10% en flux descendant.

L'éluat obtenu présente un pH de 6,5 et une extrait sec de 80 g/kg. Il est passé sur membranes d'ultrafiltration de seuil de coupure de 10 kD et de 17 m<sup>2</sup> de surface fournies par DSS, à 11°C avec un flux de perméation de 16l/h/m<sup>2</sup> jusqu'à obtenir un  
30 facteur de concentration volumique de 7.

Le rétentat a un pH de 5,9 et un extrait sec de 170 g/kg ; afin d'éliminer le sel, ce rétentat est ensuite diafiltré sur les mêmes membranes à 25°C avec de l'eau à hauteur de 70% du volume d'éluat mis en œuvre et jusqu'à obtenir un facteur de concentration volumique de 9,5 en final avec un flux de perméation de 16l/h/m<sup>2</sup>.

Le rétentat diafiltré a un pH de 6,5 et un extrait sec de 95 g/kg ; il est alors passé sur membranes de microfiltration de porosité de 1,4  $\mu\text{m}$  à 30°C avec un flux de perméation de 320 l/h/m<sup>2</sup>. Le perméat de cette microfiltration présente un pH de 6,6 et un extrait sec de 75 g/kg.

5 Ce perméat est ensuite séché sur une tour d'atomisation munie d'une turbine ; la température d'entrée en tour est de 140°C et la température de sortie est de 80°C.

L'isolat poudre ainsi obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- Humidité : 4,7%,
- 10 - Protéines (Nx6,38) : 96,2% dont :
  - Lactoferrine : 54%
  - Lactoperoxydase : 125 unité ABTS/mg
- Cendres : 0,1% dont :
  - Na : 0,02%
  - 15 Cl : 0,44%
- Pureté spectrophotométrique :  $\text{DO}^{412}/\text{DO}^{280} = 0,06$ ,

Le profil électrophorétique obtenu par isofocalisation avec révélation au nitrate d'argent est illustré par la figure 1. Sur la figure 1 on compare la répartition des points isoélectriques de la fraction protéique laitière selon l'invention (notée LN06) et un produit de référence noté Std qui est un kit de calibration protéique commercialisé par la Société Pharmacia sous la référence 17047101 et dénommé « Isoelectric Focusing Calibration Kit Broad PI 3-10 ». On constate que sont majoritairement présentes des protéines ayant des points isoélectriques élevés (autour de 8,4).

#### Exemple 2 :

25 4,4 litres de sérum acide natif de caséinerie (pH 4,7, extrait sec 65 g/kg) sont passés à 10°C sur 22 ml de résine échangeuse de cations (SPEC 70 fournie par BIOSEPPRA) à un débit de 400 ml/h en flux descendant dans une colonne ayant un diamètre de 15 mm.

30 Les protéines fixées sur la résine sont éluées par 90 ml d'une solution de chlorure de sodium à 10% en flux descendant.

Afin d'éliminer le sel, l'éluat obtenu (100 ml) est ensuite dialysé contre de l'eau déminéralisée pendant 48 heures à 4°C.

Le produit dialysé présente les caractéristiques suivantes :

- Extrait sec : 1,5 g/kg,

- pH : 5,4,
- Conductivité : 24  $\mu\text{S}$ ,
- $\text{DO}^{412} < 0,005$ ,
- $\text{DO}^{280} = 4,6$  (0,46 dilué 10 fois).

## REVENDECATIONS

1. Procédé d'isolement de protéines de lait à partir de lait ou d'un  
5 lactosérum comportant les étapes suivantes :

a) le lait ou le lactosérum est stérilisé et dégraissé ;

b) la fraction laitière issue de l'étape a) est passée sur une résine  
échangeuse de cations conditionnée dans une colonne d'élution ;

c) la fraction retenue sur la résine est éluée par une solution aqueuse  
10 salée ;

d) l'éluat résultant de l'étape c) est dessalé et stérilisé.

Ce procédé étant caractérisé en ce que :

α) la résine échangeuse de cations est une résine greffée par des  
fonctions acides fortes ;

15 le paramètre BV désignant le rapport du volume de matière première au  
volume de résine humide dans la colonne,

le paramètre SV désignant le rapport du débit d'alimentation de la  
colonne au volume de résine humide dans la colonne,

le paramètre LV désignant le rapport du débit d'alimentation de la  
20 colonne à la section de la colonne,

β) au cours de l'étape b), les paramètres de fixation ont les valeurs  
suivantes :

-  $BV_f$  est compris entre 80 et 120 ;

-  $SV_f$  est compris entre 8 et 15 h<sup>-1</sup> ;

25 -  $LV_f$  est supérieur ou égal à 3 m/h et inférieur ou égal à 4,8 m/h .

γ) au cours de l'étape c), les paramètres d'élution ont les valeurs  
suivantes :

-  $BV_e$  est compris entre 3 et 7 ;

-  $LV_e$  est inférieur à 1 m/h.

30 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le produit de  
départ est du lait de vache.

3. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes,  
caractérisé en ce que la résine échangeuse de cations est une résine greffée par des



fonctions acides fortes ayant une capacité d'échange d'ions comprise entre 200 et 1000  $\mu\text{E/ml}$ .

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la résine est greffée par des fonctions acide sulfonique ou sel de sulfonate.

5 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la résine est greffée par des fonctions propyl sulfonique ou propyl sulfonate.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la granulométrie de la résine est comprise entre 100  $\mu\text{m}$  et 900  $\mu\text{m}$ , de préférence entre 200 et 750  $\mu\text{m}$ , encore plus préférentiellement entre 250 et 600  $\mu\text{m}$

10 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que au cours de l'étape b) de fixation de la matière première, une ou plusieurs des conditions suivantes sont remplies :

-  $BV_f$  est compris entre 50 et 400 ;

-  $SV_f$  est compris entre 5 et 40  $\text{h}^{-1}$  ;

15 -  $LV_f$  est compris entre 3 et 4,3 m/h.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que au cours de l'étape b) la résine est conditionnée dans une colonne dont la température est maintenue entre 2 et 15°C,

20 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que au cours de l'étape c) d'élution des protéines fixées, l'une au moins des conditions suivantes est remplie :

-  $BV_e$  est compris entre 3 et 5 ;

-  $LV_e$  est inférieur à 0,5 m/h.

25 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que au cours de l'étape c) la résine est conditionnée dans une colonne dont la température est maintenue entre 2 et 15°C.

30 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la solution aqueuse saline employée pour la mise en œuvre de l'invention est une solution d'un chlorure d'un métal alcalin choisi parmi  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{Mg}^+$ .

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la solution aqueuse saline est une solution aqueuse de chlorure de sodium

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la solution aqueuse saline est d'une concentration comprise entre 2 et 25% en poids de sel par poids de liquide.

14. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la solution aqueuse saline a une force ionique comprise entre 1 et 2 M.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le pH de la solution aqueuse saline d'élution est compris entre 6 et 7, avantageusement entre 6,5 et 7.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le dessalage est fait par ultrafiltration et diafiltration.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que les traitements d'ultrafiltration et de diafiltration sont effectués jusqu'à l'obtention d'un perméat ayant une conductivité inférieure à 15 mS.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la stérilisation est faite par microfiltration.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le produit dessalé et stérilisé est séché de façon à obtenir la fraction laitière issue du procédé de l'invention sous forme d'une poudre.

20. Fraction protéique laitière caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 19.

21. Fraction protéique laitière, caractérisée en ce qu'elle répond aux caractéristiques suivantes :

- une teneur en protéine supérieure à 90%,
- une teneur en sels minéraux inférieure à 1%,
- une teneur en matière grasses inférieure à 1%,
- une teneur en lactose inférieure à 1%,
- une teneur en humidité inférieure à 5%,
- une teneur en lactoferrine supérieure à 30% et inférieure à 80%,
- une activité lactoperoxydase supérieure ou égale à 120 unités ABTS par mg d'isolat,
- un pH en solution à 2% compris entre 6 et 7,5,
- une pureté spectrophotométrique en UV-visible définie par un ratio  $DO^{412}/DO^{280} < 0,15$ ,
- de protéines ayant un point isoélectrique supérieur ou égal à 8,

les pourcentages étant donnés en poids par rapport au poids de matière sèche de la fraction laitière selon l'invention.

22. Fraction protéique laitière selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle répond au moins à l'une des caractéristiques suivantes :

- 5                   - une teneur en protéine supérieure à 95%,
- une teneur en sels minéraux inférieure à 0,5%,
- une teneur en matière grasse inférieure à 0,5%,
- une teneur en lactose inférieure à 0,5%,
- une teneur en humidité inférieure à 4%,
- 10               - une teneur en lactoferrine supérieure à 50% et inférieure à 80%,
- un pH en solution à 2% compris entre 6 et 7,2,
- une pureté spectrophotométrique en UV-visible définie par un ratio  $DO^{412}/DO^{280} < 0,1$ .
- des protéines ayant un point isoélectrique compris entre 8,2 et 8,7.

15               23. Fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 20 à 22, caractérisée en ce qu'elle est issue du lait de vache.

24. Association d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 20 à 23 avec du calcium.

20               25. Composition alimentaire, caractérisée en ce qu'elle comporte une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 20 à 24.

26. Kit alimentaires comprenant une poudre de fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 20 à 24.

27. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 20 à 23, pour la préparation d'un lait alimentaire

25               28. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 20 à 24, pour la préparation d'un aliment destiné à la prévention d'une pathologies sélectionnée parmi : retard de croissance, ostéoporose, fragilité osseuse, fragilité osseuse, fractures osseuses, rhumatismes, arthrose, maladies périodontales.

30               29. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 pour la préparation d'un aliment destiné à favoriser la croissance des ostéoblastes.

30. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 et un support pharmaceutiquement acceptable.

31. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 20 à 24, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement d'une pathologies sélectionnée parmi : retard de croissance, ostéoporose, fragilité osseuse, fragilité osseuse, fractures osseuses, rhumatismes, arthrose, maladies  
5 périodontales.

32. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 20 à 24, pour la préparation d'un médicament destiné à améliorer l'absorption du calcium dans l'organisme.

33. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque  
10 des revendications 20 à 24 pour la préparation d'un médicament destiné à favoriser la croissance des ostéoblastes.

34. Produit d'hygiène caractérisé en ce qu'il comprend au moins une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 20 à 24.

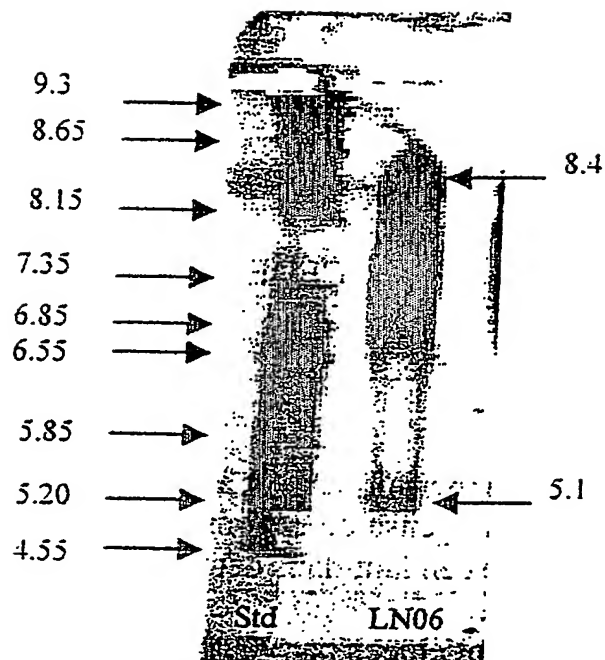


Figure 1

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1../1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 3 W / 270601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		VCstsF668/174FR
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0208934
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
ISOLAT DE PROTEINES DE LAIT ET PROCEDE POUR SA PREPARATION.		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
COMPAGNIE LAITIERE EUROPEENNE		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	Nom	SOUPPE
	Prénoms	Jérôme
Adresse	Rue	3 rue du Bois Rondel
	Code postal et ville	35700 RENNES
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
ORES Béatrice (92-4046)		
Paris, le 2 juillet 2002 		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**